动 物 学 研 究 2001, Jun. 22 (3): 246~249
Zoological Research

CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853

简 报

克仑特罗对绵羊肝脏血液中IGF-Ⅰ、GH和胰岛素水平的影响

郑元林[①②] 韩正康[②] 陈 杰[②] 艾晓杰[②] 刘根桃[②]
(①徐州师范大学生物系 徐州 221009)(②南京农业大学动物医学院 南京 210095)

关键词：绵羊；多血管导管；克仑特罗；胰岛素样生长因子；生长激素；胰岛素
中图分类号：Q959.842，Q493.99 文献标识码：A 文章编号：0254-5853(2001)03-0246-04

克仑特罗（clenbuterol，CL）为一种β-肾上腺素能受体激动剂。自80年代初发现β-受体激动剂可促进机体生长并改变机体胴体组成以来，许多研究均显示β-激动剂具促进脂肪动员、减少体脂沉积、增加氮素贮存和促进蛋白质合成等作用，进而调节机体的生长发育，因而β-激动剂又被称为"营养分重分配剂"（Yang & McElligott，1989；Cardoso & Stock，1996；Smith，1998）。然而机体内代谢水平在很大程度上受内分泌的调控。在对影响机体生长发育的内分泌研究中，越来越多的证据表明胰岛素样生长因子（insulin-like growth factors，IGFs）在促进机体生长和发育中具有特殊的作用（Schofield，1992），IGFs共有2种形式即IGF-Ⅰ和IGF-Ⅱ，主要在肝脏合成并分泌到血液中。研究表明不仅动物血液中GH水平与机体生长具有高度的相关性，而且更重要的是IGF-Ⅰ水平与生长起平行性变化，GH的促生长作用在相当程度上是通过IGF-Ⅰ来实现的（Schofield，1992；Peter *et al.*，1994）。目前对于生长调节至关重要的下丘脑—垂体—肝脏轴已受到高度重视。为此本文利用多血管导管技术在绵羊上研究CL对进出肝脏的血液中IGF-Ⅰ、GH（生长激素）和胰岛素（insulin）水平变化的影响，以期在整体水平上探讨CL影响机体生长代谢的肝脏内分泌机制。

收稿日期：2000-10-20；修改稿收到日期：2001-01-21
基金项目：国家自然科学基金（No.39570536）
②E-mail：ylzheng@public.xz.jsinfo.net

1 材料和方法

1.1 实验动物与药品

实验动物为绵羊（湖羊）4头，体重为（27.75±2.63）kg，单栏舍饲，自由采食青干草。克仑特罗（CL）为江苏金坛制药厂生产。

1.2 血管导管的安装

血管导管为医用聚乙烯导管，前端套上一段硅橡胶管。血管导管的安装主要参照Katz & Bergman（1969）及本实验室先期工作的方法。动物手术前一天禁食禁水。绵羊用戊巴比妥钠麻醉，术部剪毛消毒，于右侧最后一根肋骨后3 cm处与肋骨平行，切开长约20 cm的切口，暴露肝脏等脏器，分别在门静脉、肝静脉和肠系膜静脉处安装血管导管，并固定导管于血管管壁及其附近的组织上，然后将导管引出至皮肤外，腹部切口按常规手术方法缝合。所有导管均用荷包缝合，使血流不被完全阻断。每天均用含300 U/mL肝素钠的生理盐水冲洗疏通血管导管1次以防凝血，精心护理动物，术后约1周，待动物基本上恢复正常后，进行实验。

1.3 实验设计及血样采集

实验分为2期，先进行对照期实验，每天8:00和20:00分别从肠系膜静脉导管滴注生理盐水100 mL，持续5 d。间隔2 d后进行CL处理期实验，同样

每天 8:00 和 20:00 分别从肠系膜静脉导管滴注含 CL 的生理盐水 100 mL，CL 剂量为 0.8 mg/kg BW，持续 5 d。在对照期和 CL 处理期的最后一天分别从肝静脉和门静脉每隔 3 h 采集血样 1 次，连续采样 24 h。血样采集后立即分离出血浆，分装后于 -30℃保存待测。

1.4 IGF-Ⅰ、GH 和胰岛素的放免测定

IGF-Ⅰ 标准品由瑞士 Ciba Geigy 公司 H.H.Peter 博士惠赠。IGF-Ⅰ抗体由美国北卡罗来纳州大学 Louis E.Underwood 教授惠赠。^{125}I-IGF-Ⅰ采用氯胺-T 标记法由我室在上海生物制品研究所放免室的协助下标记。羊抗兔抗体(二抗)购自上海生物制品研究所。采用美国 Nichols Institute 提供的方法提取 IGF-Ⅰ。吸取 0.1 mL 血浆至离心管中，加入 0.9 mL 酸醇混合液(2N HCL:乙醇 = 1:7)，封口后混匀，室温孵育 30 min 后离心(4℃，1 400 g × 30 min)。取 0.2 mL 上清液至另一离心管内，加入 0.1 mL 0.855 mol Tris-Base (pH11.0)封口后混匀，室温孵育 30 min，离心(4℃，1 400 g × 30 min)。取 0.1 mL 上清液与 0.9 mL PBS(pH7.5)混匀，4℃保存待测。取 0.1 mL 制备好的 IGF-Ⅰ待测样品，同批按双抗体法测其 IGF-Ⅰ的含量。计数使用中国科学院上海原子核研究所日环仪器厂 FMJ-182 型放射免疫 γ-计数器。本测定最小检测量为 0.06 ng/mL，批内误差为 4.8%，批间误差为 8.2%。

双抗体法同批测血浆中 GH 含量。^{125}I 标记的牛长激素试剂盒由本实验室制备。本测定最小检测量为 1 ng/mL。

双抗体法同批测血浆中的胰岛素含量。^{125}I 标记试剂盒购自上海生物制品研究所。

1.5 数据统计

各期数据用平均值 ± 标准差表示。期间差异显著性用 t - 检验法检验。

2 结果

表 1 给出了在 CL 的影响下，24 h 内绵羊门静脉和肝静脉中 IGF-Ⅰ，GH 和胰岛素的平均水平。

在CL影响下，绵羊肝静脉中IGF-Ⅰ的浓度与对照期相比提高了 17.53%($P < 0.05$)，同时门静脉 IGF-Ⅰ的水平也有所提高(表 1)。显示在 CL 的影响下肝脏分泌 IGF-Ⅰ增加，使整个机体的 IGF-Ⅰ循环水平维持在一个较高的水平上。图 1a 显示了在 CL 影响下肝静脉和门静脉中 IGF-Ⅰ水平的昼夜变化。比较肝静脉和门静脉中 IGF-Ⅰ的水平，可发现肝静脉中 IGF-Ⅰ水平总是高于门静脉中的，显示肝脏持续分泌 IGF-Ⅰ到血液中。在对照期肝脏分泌 IGF-Ⅰ的动态变化过程中，可发现午后(14:00)血液中 IGF-Ⅰ水平最高。肝静脉中 IGF-Ⅰ的浓度达(309.17 ± 65.43) ng/mL 血浆，为同一时刻门静脉中 IGF-Ⅰ浓度的 150.71%($P < 0.01$)。在 CL 影响下，绵羊肝脏 IGF-Ⅰ的分泌量在整体水平上均有所提高。肝静脉中 IGF-Ⅰ的最高水平仍出现在午后，达(354.90 ± 78.89) ng/mL 血浆，与对照期相比，其提高的幅度为 14.79%($P < 0.05$)。而在清晨肝脏 IGF-Ⅰ的分泌水平最低。观察 8:00 与 20:00 两个采样点还可发现在给予绵羊肠系膜静脉滴注 CL 后，绵羊肝脏血液中 IGF-Ⅰ浓度迅即出现较大幅度的变化，其提高的程度均高于其他观察点。

在 CL 作用下，绵羊血中 GH 水平升高(表 1)。CL 处理期门静脉处 GH 的浓度较对照期提高了 33.10%($P < 0.05$)，而在肝静脉处 GH 的浓度仅提高了 3.33%($P > 0.05$)。与门静脉 GH 的水平相比也可发现，CL 处理期肝静脉 GH 降低的幅度达 35.75%($P < 0.05$)，而对照期仅降低了 17.24%($P > 0.05$)。绵羊血中 GH 水平昼夜的变化见图 1b。对照期的绵羊在午间前后门静脉和肝静脉的 GH 水平之差最大，如在 11:00 时，对照期肝静脉中 GH 浓度仅为门静脉中的 44.93%($P < 0.05$)。在 CL 作用下这一趋势不变，在 11:00 肝静脉中 GH 浓度仍相当于门静脉中的 41.85%($P < 0.05$)。但由于 GH 的整体水平在 CL 处理期要高于对照期，所以处理期中作用于肝脏部位的GH总量要高出对照期的。图1b还显

表 1 CL 对绵羊肝脏血液中 IGF-Ⅰ、GH 和胰岛素水平的影响

Table 1 Effects of clenbuterol on IGF-Ⅰ, GH and insulin concentration of liver blood in sheep

项目 (item)	IGF-Ⅰ/ng·mL^{-1}		GH/ng·mL^{-1}		胰岛素/μU·mL^{-1} (insulin)	
	门静脉 (portal vein)	肝静脉 (hepatic vein)	门静脉 (portal vein)	肝静脉 (hepatic vein)	门静脉 (portal vein)	肝静脉 (hepatic vein)
对照期 (control)	223.28 ± 12.82	252.01 ± 35.15	1.45 ± 0.49	1.20 ± 0.47	24.10 ± 5.94	18.89 ± 5.14
处理期 (treatment)	272.92 ± 39.32*	296.18 ± 38.40*	1.93 ± 0.40*	1.24 ± 0.42	17.68 ± 5.74*	13.45 ± 2.80*

* $P < 0.05$，与对照比较 (compared with control)。

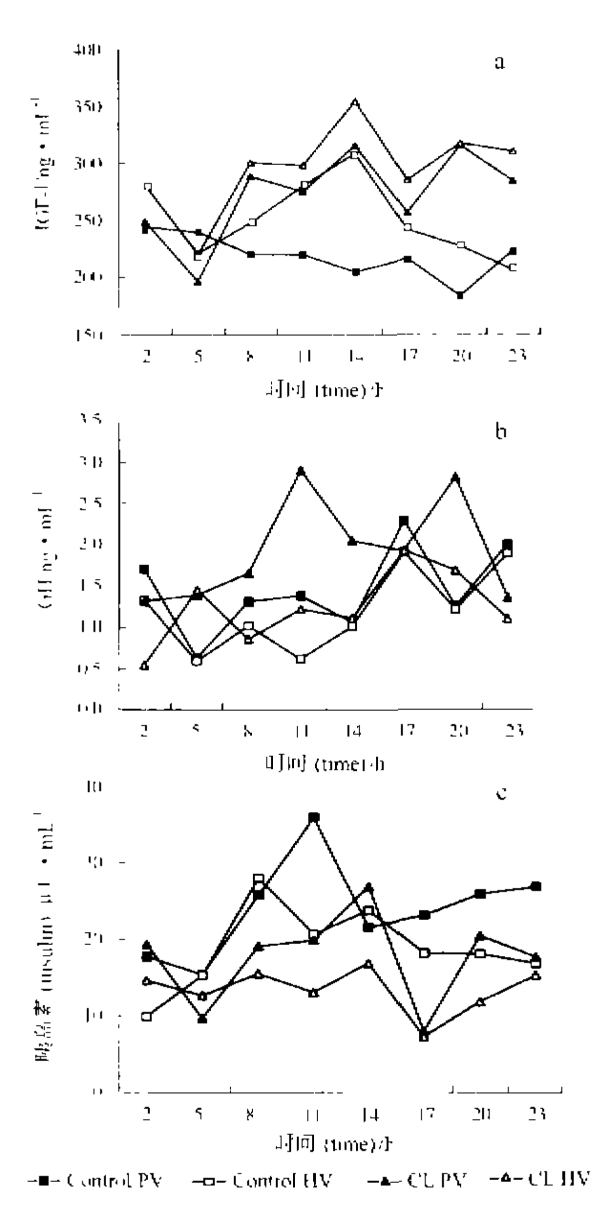


图1 CL作用下绵羊肝脏血中IGF-Ⅰ、GH和胰岛素水平的昼夜变化

Fig.1 Effects of clenbuterol on IGF-Ⅰ, GH and insulin level in sheep liver blood during 24 h

PV：门静脉（portal vein）；HV：肝静脉（hepatic vein）。图中数据为4头绵羊肝脏血中各组份的平均值（The data were the average value of four sheep）。

示在其余采样点门静脉与肝静脉间GH水平差值在CL处理期较对照期增加，并且维持这种较高差值的时间也较对照期长。

在CL的影响下，血液中胰岛素水平均有所下降（表1），门静脉和肝静脉血中胰岛素的浓度分别比对照期下降了26.64%（$P<0.05$）和28.80%（$P<0.05$）。对照期肝静脉中胰岛素的浓度较门静脉下降了21.62%，在CL处理期肝静脉中胰岛素的浓度较门静脉也下降了23.93%。绵羊血液中循环的胰岛素水平的昼夜变化见图1c。总的趋势是白天的水平高于夜间。

3 讨论

动物生长的调节是一项复杂的过程，涉及到许多激素及因子，其中β-肾上腺素能受体激动剂对机体生长代谢的调节在近20年来的研究中备受关注。许多资料显示β-激动剂可与组织的相应受体特异性结合后，强烈影响机体的代谢，促进脂肪动员，减少体脂沉积以及促进蛋白质合成等，从而改变机体胴体组成，调节机体的生长发育，起着生理性营养分重分配剂的作用（Yang & McElligott, 1989; Cardoso & Stock, 1996; Smith, 1998）。Sainz & Wolff（1990）和MacRae *et al.*（1986）发现β-激动剂可使蛋白质分解降低，氮沉积增加，而使蛋白质合成加强，增进肌肉肥大。Doheny *et al.*（1998）进一步发现CL可显著地影响机体肝脏中氨基酸代谢。Squires & Adeola（1993）以及我们实验室先前的实验均显示了CL等β-受体激动剂在整体水平上可促进猪、羊、鸭等多种动物体脂下降，血浆中的游离脂肪酸浓度升高。然而机体内代谢水平在很大程度上受内分泌的调控，并且β-受体广泛地存在于包括内分泌器官在内的体内许多部位。因此对β-受体激动剂促生长代谢作用机制的研究中，越来越多的兴趣集中在β-受体激动剂对生长轴的调控影响上。GH是调节动物生长代谢的一个关键激素，先前大量的实验充分显示出GH促进机体生长、发育和代谢的重要作用。Beermann *et al.*（1987）报道了给羊饲喂另一种β-受体激动剂CIM可使其血浆GH水平升高。在大鼠和牛上的实验也同样证明了这一点（Welsh *et al.*, 1987）。我们的实验结果显示CL可提高进入绵羊肝脏部位血浆中GH的水平，以此可调节动物生长代谢。

然而近年来体内外的研究充分显示出GH的促进生长效应主要通过IGF实现。Elsasser *et al.*（1988）显示牛血浆中IGF-Ⅰ水平很明显地与日增重相关。大量的研究资料已表明IGF是GH生长轴中的延伸部分，是该轴中最直接的促进生长代谢的因子。IGF在体内主要由肝脏产生并受GH的调控（Schofield, 1992）。鉴于肝脏又是体内的代谢中枢，因此肝脏在调节机体生长代谢的下丘脑—垂体（GH）—肝脏轴中处于一个非常重要的地位。我们通过利用多种慢性血管导管技术可直接在活体中观

察CL对生长轴中有关激素水平的影响。实验结果表明CL可增加绵羊流向肝脏中GH的水平，并且肝静脉中IGF-Ⅰ的水平也显著提高，门静脉中IGF-Ⅰ也同时维持在一个较高的水平上。提示在CL影响下机体可通过增加进入肝脏GH水平，进而影响肝脏的内分泌活动，使绵羊肝细胞中IGF-Ⅰ表达显著升高。由于IGF-Ⅰ在肝细胞内合成后即分泌入血并贮存在血液之中（Froesch *et al*., 1985），因此，在CL影响下绵羊血液中可持续维持这种高水平状态，从而促进机体的生长代谢。CL对生长轴的这种调节作用，可能是CL加强体内蛋白质合成，影响脂代谢而促进机体生长的一种神经内分泌机制。

β-激动剂对动物机体内胰岛素水平也有影响，许多实验证明β-受体激动剂降低动物血液中胰岛素水平（Mersmann, 1989; Welsh *et al*., 1987）。我们的实验结果表明CL可通过加强肝脏对胰岛素的清除而降低血液中胰岛素的水平。胰岛素是重要的抗脂解及生脂激素。提示CL促进肝脏对胰岛素清除的作用与其调节机体的营养分重分配有一定的相关性。

参 考 文 献

Beermann D H, Butler W R, Hogue D E, 1987. Cimaterol-induced muscle hypertrophy and altered endocrine status in lambs[J]. *J. Anim. Sci*, **65**:1514－1524.

Cardoso L A, Stock M J, 1996. Effect of clenbuterol on growth and body composition during food restriction in rats[J]. *J. Anim. Sci*, **74**(9):2245－2252.

Doherty M H, Waterfield C J, Timbrell J A, 1998. The effects of the beta 2-agonist drug clenbuterol on taurine levels in heart and other tissues in the rat[J]. *Amino Acids*, **15**(1－2):13－25

Elsasser T H, Rumsey T S, Hammond A C *et al*, 1988. Influence of parasitism on plasma concentrations of growth hormone, somatomedin-C and somatomedin-binding protein in calves[J]. *J. Endocrinol*, **116**:191－200

Froesch E R, Schmid C, Schwander J *et al*, 1985. Actions of insulin-like growth factors[J]. *Ann. Rev. Physiol*., **47**:443－467.

Katz M L, Bergman E N, 1969. A method for simultaneous cannulation of the sheep[J]. *Am. J. Vet. Res*, **30**:655－661

MacRae J C, Lobley G E, Skene P A, 1986. The effect of the β-adrenergic agonist clenbuterol on the energy expenditure and protein turnover of wether lambs[J]. *J Anim. Sci*, **63**(suppl 1):453

Mersmann H J, 1989. Acute changes in blood flow in pigs infused with β-adrenergic agonists[J]. *J. Anim. Sci*, **67**:2913－2920.

Peter M A, Winterhalter K H, Schmid C *et al*, 1994. Expression and regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-Ⅰ) and IGF-binding protein messenger ribonucleic acid levels in tissues of hypophysectomized rats infused with IGF-Ⅰ and growth hormone[J]. *Endocrinology*, **135**:2558－2567

Sainz R Z, Wolff J E, 1990. Evaluation of hypotheses regarding mechanisms of action of growth promotants and repartitioning agents using a stimulation model of lamb metabolism and growth[J]. *Anim. Prod*., **51**:551－558

Schofield P N, 1992. The Insulin-like Growth Factors: Structure and Biological Functions[M]. New York: Oxford University Press, 12－43

Smith D J, 1998. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of beta-adrenergic agonists in livestock[J]. *J. Anim. Sci*, **76**(1):173－194

Squires E J, Adeola O, 1993. The role of growth hormone, β-adrenergic agents and intact males in pork production: A review[J]. *Can. J. Anim. Sci*., **73**:1－23

Welsh T H, Smith Jr S B, Sutton M R, 1987. Growth hormone releasing factor and clenbuterol regulation of bovine growth hormone secretion *in vitro*[J]. *J. Anim. Sci*, **65**:279A.

Yang Y T, McElligott M A, 1989. Multiple actions of β-adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue[J]. *Biochem. J*, **261**(1):1－10

Effects of Clenbuterol on IGF-Ⅰ, GH and Insulin Level of Hepatic Blood in Sheep

ZHENG Yuan-Lin[1] HAN Zheng-Kang CHEN Jie AI Xiao-Jie LIU Gen-Tao

(①Department of Biology, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221009, China)

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Four sheep installed chronic catheters in the portal vein, hepatic vein and mesenteric vein were used to study the effects of clenbuterol on metabolic hormones. The results are: ①The GH level of portal vein is markedly increased during clenbuterol treatment period (0.8 mg/kg BW, twice daily for five days); ② The GH level of hepatic vein with clenbuterol-treated is similar to that of control; ③The IGF-Ⅰ concentration of hepatic vein is markedly elevated and IGF-Ⅰ of portal vein is maintained a higher level in clenbuterol treatment period. ④The insulin concentration of hepatic blood is decreased with clenbuterol-treated. These showed that the changes of those hormone levels in clenbuterol treatment played an important role in regulation of growth and metabolism in sheep.

Key words: Sheep; Chronic catheter; Clenbuterol; IGF; GH; Insulin